

BEST AVAILABLE COPY

Rec'd PCT/PTO 29 JUL 2004 293

1500293



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年5月13日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/040315 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/58, 33/68, 33/50, B82B 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2002/012917

(22) 国際出願日: 2002年12月10日 (10.12.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-314658
2002年10月29日 (29.10.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 大野 清春 (OONO,Kiyoharu) [JP/JP]; 〒657-8501 兵庫県神戸市

灘区六甲台町1-1 神戸大学遺伝子実験センター内 Hyogo (JP). 小松 節子 (KOMATSU,Setsuko) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 高岩文雄 (TAKAIWA,Fumio) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AU, CA, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (CH, DE, FR, GB, IT, NL).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING LABELED NUCLEIC ACID OR PROTEIN

(54) 発明の名称: 標識された核酸またはタンパク質の製造方法

(57) Abstract: It is found out that nucleic acids and proteins can be effectively distinguished and identified regardless of the type or number thereof by bonding the nucleic acids or proteins to a large scale integrated circuit (LSI) allowing external reading and writing in a non-contact mode and recording the data of the nucleic acids or proteins in the LSI.

(57) 要約:

外部より非接触的に書き込み及び読み込み可能なLSI (Large scale integrated circuit) と核酸やタンパク質とを結合させ、核酸やタンパク質の情報をLSIに記録することにより、特に核酸やタンパク質の種類の数に制限なく、これらを効率的に識別し同定することが可能であることを見出した。

WO 2004/040315 A1

- 1 -

明細書

標識された核酸またはタンパク質の製造方法

技術分野

本発明は、標識された核酸またはタンパク質を製造する方法に関し、特に標識がアイソトープや色素によらない方法に関する。

背景技術

従来、核酸やタンパク質を識別し、同定するための手段としては、一般的に、³²P、¹⁴C、³H、¹²⁵Iなどの放射性同位元素を利用して核酸やタンパク質を標識することが行われてきた。また、多種類の核酸を識別し、同定するための手段としては、特性の異なった蛍光を発するピーズ、例えば、Luminex100などで核酸を標識することが行われてきた。

しかしながら、この蛍光を用いた方法においては、最大の識別数が異なった蛍光を発する蛍光ピーズの種類に依存してしまうため、100種類以上の核酸を識別するためには、異なった蛍光を発する同数のピーズを開発する必要があった。このため、この方法では、例えば、イネのDNAのクローン50,000種類あるいはタンパク質10,000種類に対して、それぞれ異なる標識を行うことは不可能であり、その識別数に限界があった。

発明の開示

本発明は、このような問題点を解決するためになされたもので、その目的とするところは、核酸やタンパク質を、その種類の数に制限されることなく、効率的に標識することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく銳意研究を行った結果、外部より非接触

的に書き込み及び読み込み可能なLSI (Large scale integrated circuit) と核酸やタンパク質とを結合させ、核酸やタンパク質の情報をLSIに記録することにより、10000種以上もの多種類の核酸やタンパク質であっても効率的に識別し同定することが可能であることを見出した。本発明の方法は、従来のように物質を利用して標識するのではなく、情報をを利用して標識することを特徴とするため、標識可能な物質の種類に特に制限はなく、LSIへの記録という作業を通じて簡単に標識が可能である。従って、ゲノム解析の成果として見出された多量の核酸や蛋白質であっても、本発明によれば網羅的かつ効率的に標識することが可能である。

本発明は、より詳しくは、

- (1) 標識された核酸またはタンパク質を製造する方法であって、核酸またはタンパク質とLSIとを結合させ、特定の情報をLSIに記録することを特徴とする方法、
- (2) 特定の情報が、LSIが結合される核酸または蛋白質の特徴である、(1)に記載の方法、
- (3) 核酸またはタンパク質とLSIとの結合において、基質を介在させる、(1)に記載の方法、
- (4) 基質が、セルロース酢酸ビニル、アルファシアノアクリレート、シリコン変性ポリマー、エポキシ樹脂、および硫酸カルシウムからなる群より選択される、(3)に記載の方法、
- (5) タンパク質とLSIとの結合において、該タンパク質に結合する抗体を介在させる、(1)に記載の方法、
- (6) タンパク質の糖鎖とLSIとを結合させ、タンパク質の糖鎖の特徴をLSIに記述する、(1)に記載の方法、を提供するものである。

本発明は、標識された核酸またはタンパク質を製造する新規な方法を提供する。本発明の方法は、核酸またはタンパク質とLSIとを結合させ、特定の情報をLSI

に記録することを特徴とする。

本発明において「LSI」とは、通信制御を行うICやマイコン不揮発性メモリー等により構成されるLSIチップを意味する。本発明に用いる「LSI」としては、外部からの書き込み及び読みとりができるものであれば特に制限はない。LSIのメモリーは、数10万から数100万の分子を識別するためには、好ましくは32億ビット以上を有する。本発明に用いるLSIは、取り扱い易さの観点から微少であることが好ましい。LSIの市販品としては、ICカードやミューチップ（日立）を例示することができる。また、非接触型ICカードを本発明に用いることも可能である。

本発明において「核酸」とは、DNAおよびRNAなどのポリヌクレオチドを意味する。本発明に用いる核酸の形態は、一本鎖であっても、二本鎖であってもよく、直鎖状であっても、環状であってもよい。これら核酸は、天然由来であっても、人為的に合成したものであってもよい。また、DNAは、cDNAであってもゲノムDNAであってもよい。本発明において用いる核酸分子は、ベクターに挿入された形態でありうる。

また、本発明において「蛋白質」とは、アミノ酸同士がペプチド結合により結合した分子を意味する。従って、本発明の蛋白質には、完全な蛋白質のほか、いわゆるオリゴペプチドやポリペプチドも含まれる。また、天然由来でもよく、人工的に合成されたペプチドであってもよい。

LSIと核酸または蛋白質との結合の形態としては、安定した結合を維持しうる限り特に制限はなく、共有結合、ファンデルワールス力、水素結合等が考えられる。例えば、固相法によりLSIに蛋白質のアミノ基、カルボキシル基、アビジン基などを共有結合させることにより、LSIと蛋白質とを結合させることができる。

本発明におけるLSIと核酸または蛋白質との「結合」は、直接的であっても、間接的であってもよい。従って、核酸またはタンパク質とLSIとの結合において

は、例えば、基質を介在させることもできる。基質としては、親水性のものが好ましく、例えば、セルロース酢酸ビニル、アルファシアノアクリレート、シリコン変性ポリマー、エポキシ樹脂、硫酸カルシウムなどを本発明に用いることができる。疎水性のものであっても、その後の処理により親水性になるものであれば、本発明において好適に用いることができる。例えば、フッ素樹脂は疎水性であるが、レーザー光処理によりカルボン酸を生成して親水性になるため、本発明に適用しうる。基質とLSIとの結合あるいは基質と核酸やタンパク質との結合は、例えば、吸着あるいは包埋の手法で行うことが可能である。

また、蛋白質を標識する場合には、基質を用いる以外に、蛋白質に特異的な親和性を有する化合物、例えば、抗体を用いることができる。抗体は、蛋白質に特異性を有する限り、その形態に特に制限はなく、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。また、一本鎖抗体や抗体の断片であってもよい。

本発明においては、核酸または蛋白質に結合されたLSIに「特定の情報」を記録することにより、該核酸または蛋白質を標識する。特定の情報としては、識別可能な情報であれば特に制限はなく、例えば、個々の核酸や蛋白質の特徴であってもよい。核酸や蛋白質の特徴としては、例えば、鎖長、鎖の数、分子量、糖鎖の特徴、活性、機能、由来などが挙げられるが、これらに制限されない。

LSIに記録された情報は、非接触的に電磁波で読み取ることができるため、本発明によれば蛋白質や核酸の識別は容易に行うことができる。また、LSIを用いれば、一群の核酸や蛋白質を電磁波の塊として読み取ることができる。このため、従来のDNAアレイや蛋白質アレイのようにガラス等の基板上に整列させることなく、簡便に一群の核酸や蛋白質を分類することができる。

図面の簡単な説明

図1は、種々の基質を利用してLSIとフォスフォリーゼとを結合させた場合

- 5 -

における、フォスフォリラーゼの回収率を示す電気泳動像を示す写真である。

図2は、種々の基質を利用してLSIとアルブミンとを結合させた場合における、アルブミンの回収率を示す電気泳動像を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例を制限するものではない。

[実施例1] LSIで標識された核酸の調製

LSI上に貼り付けた基質、セルロース酢酸ビニル（1）、アルファシアノアクリレート（2）、シリコン変性ポリマー（3）、エポキシ樹脂（4）、硫酸カルシウム（5）上に、グルテリンcDNAあるいはリボゾーム遺伝子を添加し、3ヶ月冷蔵庫にて放置した。その後100mLの溶解緩衝液（1 mM EDTA, 0.5 M NH₄OAc, 10 mM MgCl₂, 0.1% SDS）にて回収後、70%エタノール沈殿にて濃縮し、1%アガロースゲル電気泳動にて回収率を確認した。（5）の硫酸カルシウムにおいては核酸が吸着されてしまい回収ができなかったが、その他の基質については30%位の割合で回収できた。

[実施例2] LSIで標識されたタンパク質の調製

LSI上に貼り付けた基質、セルロース酢酸ビニル（1）、アルファシアノアクリレート（2）、シリコン変性ポリマー（3）、エポキシ樹脂（4）、硫酸カルシウム（5）上に、精製タンパク質であるフォスフォリラーゼあるいは牛血清アルブミンを5mL（1 mg）添加し、3ヶ月冷蔵庫にて放置した。その後、5mLの試料用緩衝液（SDS-sample buffer）にて回収後、SDS-PAGE電気泳動しクマシープリリアントブルー染色・脱色にて回収率を確認した（図1および図2）。図中、Cは対象を示し、精製タンパク質である1 mgフォスフォリラーゼあるいはアルブミンを直接電気泳動した。シリコン変性ポリマー（3）においてフォスフォリラーゼについては100%、アルブミンについては90%の回収率を示した。

産業上の利用の可能性

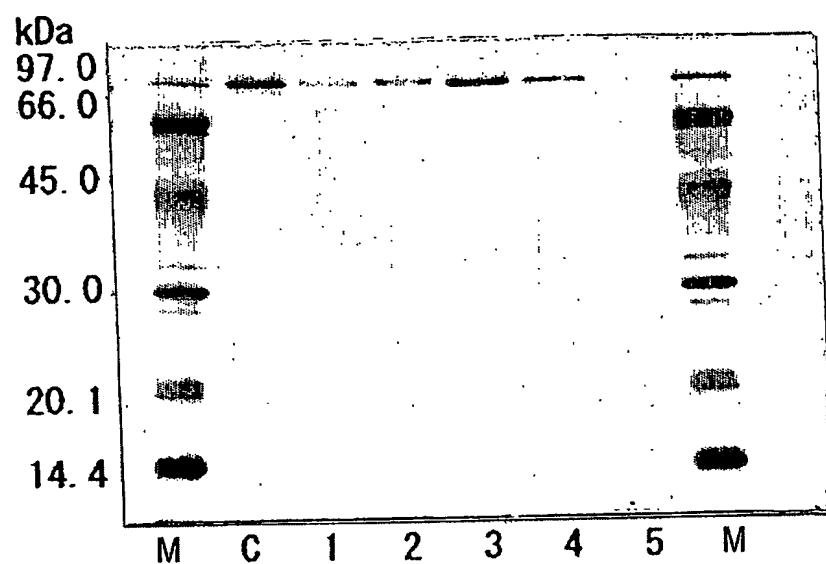
従来は、多種類の核酸や蛋白質を識別するために、その種類の数に応じて、異なるシグナルを発する「物質」を開発する必要があったが、本発明の方法は、LS Iという同一の物質に、識別すべき核酸や蛋白質に応じた異なる「情報」を記録し、情報の差異に基づいて識別するという手法を採用している。このため、情報の種類に制限がない以上、理論上は、識別しうる核酸や蛋白質の種類の数にも制限はない。さらに、識別が情報の内容によるため簡便かつ確実であり、また、常時認識できるという利点も有する。従って、本発明により、標識しうる核酸および蛋白質の種類および標識の効率を飛躍的に向上させることが可能となった。

請求の範囲

1. 標識された核酸またはタンパク質を製造する方法であって、核酸またはタンパク質とLSIとを結合させ、特定の情報をLSIに記録することを特徴とする方法。
。
2. 特定の情報が、LSIが結合される核酸または蛋白質の特徴である、請求項1に記載の方法。
3. 核酸またはタンパク質とLSIとの結合において、基質を介在させる、請求項1に記載の方法。
4. 基質が、セルロース酢酸ビニル、アルファシアノアクリレート、シリコン変性ポリマー、エポキシ樹脂、および硫酸カルシウムからなる群より選択される、請求項3に記載の方法。
5. タンパク質とLSIとの結合において、該タンパク質に結合する抗体を介在させる、請求項1に記載の方法。
6. タンパク質の糖鎖とLSIとを結合させ、タンパク質の糖鎖の特徴をLSIに記述する、請求項1に記載の方法。

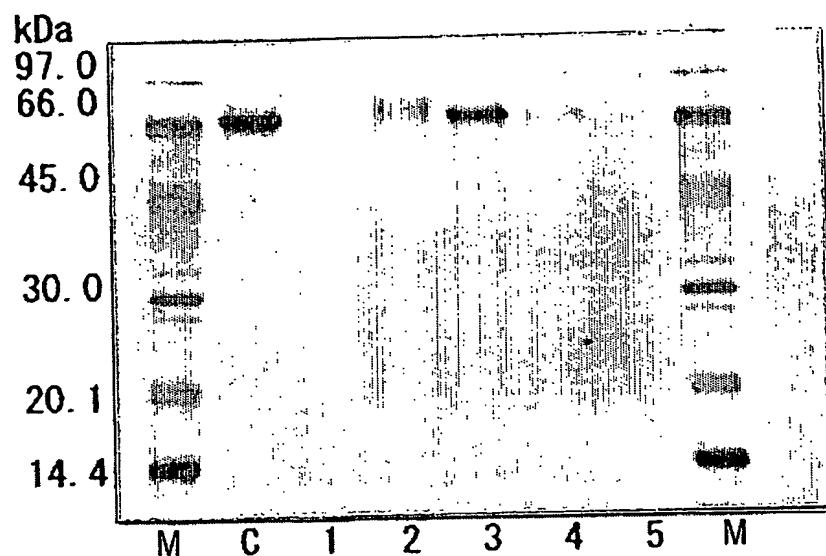
1 / 2

図 1



2 / 2

図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/12917A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl' G01N33/58, G01N33/68, G01N33/50, B82B1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl' G01N33/58, G01N33/68, G01N33/50, B82B1/00, C07K1/13Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6207392 B (The Regents of the University of California), 27 March, 2001 (27.03.01), & WO 00/55631 A & AU 200037127 A & EP 1166118 A	1-6
A	JP 2001-504277 A (Nanomagnetics Ltd.), 27 March, 2001 (27.03.01), & GB 2319253 A & WO 98/22942 A & AU 9749600 A & CN 1238059 A & BR 9713083 A & KR 2000053057 A & MX 9904542 A & EP 1217616 A & DE 69714602 A	1-6
A	JP 2001-147231 A (Hitachi Maxell, Ltd.), 29 May, 2001 (29.05.01), (Family: none)	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 January, 2003 (08.01.03)Date of mailing of the international search report
21 January, 2003 (21.01.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N 33/58 G01N 33/68 G01N 33/50 B82B 1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N 33/58 G01N 33/68 G01N 33/50 B82B 1/00 C07K 1/13

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 6207392 B (The Regents of the University of California) 2001.03.27 & WO 00/55631 A & AU 200037127 A & EP 1166118 A	1-6
A	JP 2001-504277 A (ナノマグネットィックス リミテッド) 2001.03.27 & GB 2319253 A & WO 98/22942 A & AU 9749600 A & CN 1238059 A & BR 9713083 A & KR 2000053057 A & MX 9904542 A & EP 1217616 A & DE 69714602 A	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.01.03

国際調査報告の発送日

21.01.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2 J 9407



電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP 2001-147231 A(日立マクセル株式会社)2001.05.29 (ファミリーなし)	1-6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.